

BEST AVAILABLE COPY

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11063 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/85, A61K 31/70 // C07K 14/47

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02726

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. August 2000 (10.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 37 308.6 10. August 1999 (10.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): HEPAVEC AG FÜR GENTHERAPIE [DE/DE];
Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TIEMANN, Frank
[DE/DE]; Wachsmuthstrasse 22, 13467 Berlin (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Friedrich; Robert-Rössle-Strasse
10, 13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENE TRANSFER COMBINATION VECTORS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND UTILIZATION THEREOF

(54) Bezeichnung: KOMBINATIONSEKTOREN FÜR DEN GENTRANSFER, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to novel gene transfer combination vectors consisting of a single DNA molecule comprising several expressible genes. The invention also relates to a method for the production of said combination vectors and to their utilization in the therapy of malignant diseases and other hyperplasia. The invention can be used in the field of medicine and in the pharmaceutical industry.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Kombinationsvektoren für den Gentransfer, die aus einem einzelnen DNA-Molekül bestehen, das mehrere exprimierbare Gene umfaßt. Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Kombinationsvektoren und ihre Verwendung zur Therapie maligner Erkrankungen und anderer Hyperplasien. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

WO 01/11063 A2

Kombinationsvektoren für den Gentransfer, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Kombinationsvektoren für den Gentransfer, die aus einem einzelnen DNA-Molekül bestehen, das mehrere exprimierbare Gene umfaßt. Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Kombinationsvektoren und ihre Verwendung zur Therapie maligner Erkrankungen und anderer Hyperplasien. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Eine Reihe von Verfahren werden bis heute zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt. Eine besondere Bedeutung kommt dabei nach wie vor der chirurgischen Entfernung des Tumors aus dem angrenzenden gesunden Gewebe zu. Kann ein Tumor nicht mehr durch mechanische Verfahren entfernt werden, werden in der Regel Chemotherapeutika eingesetzt, die in den Zellstoffwechsel bzw. Zellzyklus eingreifen und damit mehr oder weniger spezifisch die Vermehrung von Tumorzellen verhindern oder diese sogar abtöten.

Grundlegendes Problem dieser Mittel sind ihre teilweise erheblichen Nebenwirkungen. Diese ergeben sich aus der Tatsache, daß neben den Tumorzellen auch alle sich schnell teilenden gesunden Zellen des menschlichen Organismus getroffen werden. Hierzu gehören insbesondere die Zellen des hämatopoetischen Systems, sowie Zellen epithelialen Ursprungs. Weiterhin konnte beobachtet werden, daß viele Tumorarten nach einiger Zeit der Behandlung Resistenzen gegen die eingesetzten Chemotherapeutika entwickeln. Letztere haben sich aus diesem Grund nur bei einigen wenigen Tumorerkrankungen, wie z.B. Leukämien, als ausreichend wirksam erwiesen. In den meisten Fällen kommt ihnen jedoch lediglich palliative Bedeutung zu.

Mit zunehmender Charakterisierung des Profiles der Genexpression unterschiedlicher Tumorarten bzw. Stadien wurden in den letzten Jahren grundlegende neue Strategien für die Therapie maligner Erkrankungen entwickelt.

Das Konzept der sogenannten Gentherapie hat zum Ziel mit Genen oder deren Produkten selektiv das Wachstum und die Vermehrung von Tumoren und anderen Hyperplasien zu inhibieren. Dabei kommt dem Einsatz von Vakzinen, dem Gentransfer von Zytokinen, der selektive Aktivierung von "prodrugs" durch sogenannte "suicide"-Gene und dem Einsatz

2

von Zellzyklus-Regulatorgenen zur selektiven Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose) in Tumorzellen besondere Bedeutung zu.

Im Mittelpunkt des Zusammenspiels der unterschiedlichen Phasen der Zellentwicklung steht der Zellzyklus. Signalkaskaden, die den Zellzyklus steuern, definieren, ob eine Zelle im Zellzyklus verbleibt und proliferiert oder aber diesen verläßt und in die Differenzierung, Seneszenz oder Apoptose eintritt. Weiterhin steuern diese Kontrollgene oder sogenannten „checkpoints“ des Zellzyklus wie eine Zelle auf Streß oder Zellschädigungen antwortet. Signalkaskaden, die Reparaturfunktionen bei Zellschädigungen steuern sind unmittelbar mit dem Zellzyklus verzahnt.

Unter Berücksichtigung der dargestellten Komplexität von Steuerungsmechanismen in Zelle und Organismus, überrascht es nicht, daß die Tumorentstehung (Tumorigenese) ein mehrstufiger Prozeß ist. Nach der sogenannten „Vogelstein-Hypothese“ müssen eine Reihe von unterschiedlichen Kontrollgenen ausgeschaltet werden, bevor aus einer normalen Zelle eine maligne Tumorzelle entsteht. Dabei sind insbesondere Zellzykluskontrollgene und Reparaturkontrollgene das Ziel von genetischen Veränderungen.

Aus wissenschaftlichen Arbeiten der letzten Jahre geht hervor, daß das Retinoblastoma Tumorsuppressorgen pRb und die zugehörige Signalkaskade in bis zu 100% der Tumorzellen Ziel von genetischen Veränderungen ist. pRb kontrolliert den Übergang einer Zelle von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. Das Tumorsuppressorgen p53 ist in mindestens 50% aller humanen Tumore Ziel von genetischen Veränderungen. p53 kontrolliert die genomische Integrität der menschlichen Zelle und stellt somit einen wichtigen Verknüpfungspunkt zwischen Zellzyklus und Reparaturmechanismen dar. Um Tumorzellen vor vorzeitiger Alterung zu schützen, wird in der Regel das Enzym Telomerase aktiviert. In normalen somatischen Zellen des humanen Organismus ist diese Enzym abgeschaltet. Ihre Lebensspanne ist somit begrenzt, wogegen Tumorzellen eine unendliche Lebensspanne haben. In einer hervorragenden Arbeit aus dem Labor von Robert Weinberg (Hahn et al., 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature 400, 464-468.) konnte gezeigt werden, daß eine normale humane Zelle durch einen gezielten Eingriff mit definierten genetischen Elementen in eine Tumorzelle umgewandelt werden kann. Aktivierung der Telomerase, Expression der onkogenen Form des Ras-Gens und die Inaktivierung der pRb und p53 Signalkaskaden reichen nach Meinung dieser Wissenschaftler aus, um eine normale in eine Tumorzelle zu überführen.

3

Ein Durchbruch in der Tumorthherapie konnte allerdings bisher noch mit keiner der oben genannten Methoden für sich allein erreicht werden. Aus diesem Grund wird weiterhin intensiv nach alternativen Strategien in der Gentherapie für die Tumorthherapie gesucht.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, weitere Mittel zur Gentherapie zu entwickeln und geeignete Vektorsysteme mit entsprechenden Expressionskassetten bereitzustellen, die die effektive Expression therapeutischer Gene in Tumorzellen gestatten.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, daß zur erfolgreichen Tumorthherapie der Synergismus mehrerer unterschiedlicher Komponenten notwendig ist. Da in der Regel in der Tumorzelle mehrere Signalkaskaden defekt sind, kann das Wachstum und die Vermehrung dieser Zellen nur dann gestoppt werden, wenn möglichst viele der ausgefallenen Signalwege wieder restauriert werden. Verwendung finden hierbei insbesondere Gene, die Zellfunktionen steuern bzw. kontrollieren.

Grundlage der Erfindung ist demzufolge die Überlegung, daß der menschliche Organismus sehr komplexen Regulationsmechanismen unterliegt. Dies gilt gleichermaßen für jede einzelne Zelle des Organismus. Ein komplexes genetisches Programm steuert und kontrolliert unterschiedlichste Zellfunktionen über eine Vielzahl von Signalkaskaden, welche zum Teil parallel verlaufen oder sogar zueinander redundant sein können. Im Laufe der Entwicklung des Organismus werden auf diesem Wege entscheidende Funktionen des Überlebens sichergestellt. Dies betrifft insbesondere die räumliche Anordnung, Entwicklung und Funktion der einzelnen Zelle im Organismus, sowie die Organisation der Immunabwehr. Räumliche Anordnung, Entwicklung und Funktion der einzelnen Zelle im Organismus ergeben sich wiederum aus dem Zusammenspiel von Zellproliferation, Differenzierung, Zellalterung (Seneszenz) und Apoptose.

Die Aufgabe der Erfindung wurde mit einem neuartigen Kombinationsvektor für den Gentransfer realisiert, welcher ein einzelnes DNA-Molekül enthält und zwei oder mehrere unterschiedliche exprimierbare, vorzugsweise therapeutische, Gene umfaßt. Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Als therapeutische Gene kommen insbesondere Zellzykluskontrollgene, Tumorsuppressorgene, Differenzierungsgene, Seneszenz-induzierende Gene und Apoptose-induzierende Gene in Frage. Die gemeinsame Restaurierung von

Zellzykluskontrolle und Reparaturkontrolle führt erfindungsgemäß in der Regel zur Induktion von Apoptose in den betroffenen Tumorzellen.

In verschiedenen Ausführungsvarianten der Erfindung sind die unterschiedlichen therapeutischen Gene im Kombinationsvektor entweder,

1. als voneinander unabhängige funktionelle Transkriptionseinheiten (Abbildung 1A) bevorzugt in Form von Expressionskassetten unter Verwendung eines DNA-Spacers, vorzugsweise mindestens 20 Nukleotide umfassend, oder
2. als eine einzige polycistronisch organisierte funktionelle Transkriptionseinheit (Abbildung 1B) bevorzugt unter Verwendung einer Expressionskassette, die jeweils zwischen den Genen eine 'internal ribosome entry site' (IRES-Sequenz) aufweist, wodurch dann die einzelnen Gene in ihre Proteine translatiert werden, oder
3. als Fusionsgen (Abbildung 1C) enthalten.

Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß die miteinander kombinierten Gene, welche für unterschiedliche Proteine kodieren, die Zellfunktionen steuern oder kontrollieren, in einem geeigneten Vektor kloniert vorliegen und für den Gentransfer in Tumorzellen oder andere hyperplastische Zellen eingesetzt werden.

Als Vektoren finden bevorzugt solche Verwendung, die eine optimale Infektion von bis zu 100% der Zielzellen ermöglichen. Solche Vektoren können zum Beispiel von humanen oder nicht-humanen Adenoviren, Retro- oder Lentiviren, AAV oder Baculoviren abgeleitet sein. Bei Einsatz nicht-viraler Vektoren würde für den Transfer des Vektors in die Zielzellen gegebenenfalls ein entsprechendes Transfektionsmittel verwendet. Die Auswahl des Vektors erfolgt dabei so, daß die Expression der therapeutischen Gene nach Möglichkeit spezifisch nur in den Zielzellen erfolgt. Dies wird zum Beispiel durch die Wahl entsprechend geeigneter Promotoren realisiert.

Wie bereits ausgeführt sind zur Kombination bevorzugte therapeutische Gene solche, die Zellfunktionen steuern oder kontrollieren. Besonders bevorzugt werden gemäß vorliegender Erfindung folgende Gene in Kombinationsvektoren bereitgestellt:

1. Tumorsuppressorgen p16ink4a mit Tumorsuppressorgen p53, p73 oder p63
2. Tumorsuppressorgen p14ARF mit Tumorsuppressorgen p53, p73 oder p63
3. Apoptose-induzierendes Gen wig-1 mit Tumorsuppressorgen p16ink4a oder p14ARF
4. Alle unter 1 bis 3 genannten Kombinationen und zusätzlich ein Telomerase-hemmendes Gen

5. Alle unter 1 bis 4 genannten Kombinationen, wobei mehrere der Kombinationspartner in Folge von Modifikationen verändert vorliegen können.

Modifikationen verändern die Gensequenz des entsprechenden Gens insofern, als daß sie mutiert, verlängert, verkürzt oder neu angeordnet würde. Gemäß der Erfindung werden solche modifizierten Gene eingesetzt, die grundsätzlich die therapeutischen Eigenschaften des entsprechenden Gens verbessern. Eine Verbesserung der Transduktionseigenschaften wird zum Beispiel durch eine Verlängerung der therapeutischen Gensequenz mit den Sequenzen von VP22 oder tat erreicht. Funktionelle Eigenschaften eines therapeutischen Genprodukts werden grundsätzlich durch eine Neuordnung der Gensequenz erreicht. Hierbei werden entweder einzelne funktionelle Domänen oder die gesamte DNA Sequenz des therapeutischen Gens willkürlich neu zusammengesetzt. Auf diese Weise können tausende neuer Produkte entstehen. Mit einem geeigneten Testsystem werden dann diejenigen der neuen Genprodukte herausselektioniert, die verbesserte therapeutische Eigenschaften aufweisen.

Die hier beschriebene Erfindung stellt eine Alternative zu den bekannten Strategien für die Tumorthherapie dar. Im Vergleich mit bereits etablierten Mitteln wird ein neues Mittel mit besserer Wirksamkeit zur Therapie von Tumoren und anderen Hyperplasien bereitgestellt. Dabei wird das Wachstum und die Vermehrung (Zellteilung) bereits vorhandener entarteter Zellen gehemmt und diese werden in die Apoptose getrieben. Die Ansiedlung von sekundären Tumormetastasen kann ausgehend vom bereits vorhandenen Primärtumor von vornherein verhindert werden.

Wenn auch der Synergismus mehrerer therapeutischer Gene zu einem sogenannten „Conflict of interest“ in der Tumorzelle führen kann, was in der Regel auch Apoptose in diesen Zellen provoziert, so geht in jedem Falle der therapeutische Nutzen durch die Kombination von Genen aus den oben genannten Bereichen deutlich darüber hinaus, der durch die jeweiligen Gene allein erzielt werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung der neuartigen Kombinationsvektoren insbesondere für den Einsatz auf veränderte, auch krankhafte Erscheinungen in Zellen oder Zellkomplexen, vorzugsweise zur therapeutischen Behandlung von Tumoren, wie z.B. zur Behandlung von Lebertumoren, Mammakarzinomen, Lungentumoren, Melanomen, Prostata Tumoren, Tumormetastasen.

6

Die Herstellung der Kombinationsvektoren erfolgt nach an sich üblichen rekombinanten DNA-Technologien. Die Vektoren liegen als virale Expressionsvektoren, wie z.B. adenovirale Vektoren vor oder der Vektor wird in entsprechenden permissiven Zellen produziert. Diese Vektoren enthalten die spezifischen Expressionskassetten, welche einen Promotor und die jeweiligen Gene aufweist, wobei der Promotor für die Expression des Gens/der Gene in den Zielzellen sorgt. Häufig zum Einsatz kommende Promotoren sind z.B. SV40, RSV und CMV.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele näher erläutert werden, auf die sie jedoch nicht zu beschränken ist.

Beispiele**1. Beispiele für den Aufbau von Kombinationsvektoren:**

- a. Vektor mit zwei oder mehr funktionellen Expressionskassetten, welche unabhängig voneinander hintereinander geschaltet sind (Abb. 1A): Die komplette cDNA des humanen Gens 1 wird über eine entsprechende Schnittstelle in die Expressionskassette 1 des Vektors pX kloniert. Die Expressionskassette 1 beinhaltet den CMV-Promoter und ein SV40-PolyA. Die komplette cDNA des humanen Gens 2 wird über eine entsprechende Schnittstelle in die Expressionskassette 2 des selben Vektors pX kloniert. Die Expressionskassette 2 beinhaltet den RSV-Promoter und ein Bovine growth hormon-PolyA (BGH-PolyA). Expressionskassette 2 liegt downstream (3') von Expressionskassette 1 und ist von dieser durch einen mindestens 20 Nukleotide langen DNA-Spacer getrennt. Ausgehend von den jeweiligen Promotoren werden zwei voneinander unabhängige Produkte transkribiert und translatiert.
- b. Vektor mit einer polycistronisch organisierten funktionellen Transkriptionseinheit, die mehrere therapeutische Gene miteinander kombiniert (Abb. 1B): Vektor pY besteht aus dem Vektor Backbone und einer Expressionskassette, die linear von 5' nach 3' wie folgt aufgebaut ist: CMV-Promoter – Schnittstelle 1 – internal ribosome entry site (IRES) – Schnittstelle 2 – SV40-PolyA. Die komplette cDNA des humanen Gens 1 wird in Schnittstelle 1 des Vektors pY kloniert. Die komplette cDNA von Gen 2 wird in Schnittstelle 2 des selben Vektors kloniert. Dementsprechend wird ausgehend vom CMV-Promoter eine RNA transkribiert, die sowohl die cDNA von Gen 1, die IRES-Sequenz, als auch die cDNA von Gen 2 enthält. Aufgrund der IRES-Sequenz können dann sowohl Gen 1 als auch Gen 2 in ein Protein translatiert werden.

- c. Vektor mit Fusionsgenen (Abb. 1C): Die komplette cDNA des humanen Gens 1 und die komplette cDNA des humanen Gens 2 werden im selben Leserahmen („in frame“) über entsprechende Schnittstellen in die Expressionskassette 1 des Vektors pZ kloniert. Die Expressionskassette 1 beinhaltet den CMV-Promoter und ein SV40-PolyA. Ausgehend vom CMV-Promoter wird ein Fusionsprodukt transkribiert und translatiert.

2. Beispiele für therapeutische Genkombinationen

- a. HV-011 ist ein rekombinanter adenoviraler Vektor, der in der Gentherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden kann. Die adenovirale E1 Region wurde in HV-011 durch zwei voneinander unabhängige Expressionskassetten ersetzt (siehe oben). Die 5'-Expressionskassette führt zur Expression des Tumorsuppressorgens p53, die 3'-Expressionskassette zur Expression von p16ink4a. HV-011 wurde nach den für in der Gentherapie genutzten rekombinanten Adenoviren üblichen Verfahren hergestellt. Die Tumorzelllinien HuH7 und Hep3B werden bei gleicher MOI mit HV-011, Ad-p53, Ad-p16, Ad-βgal infiziert. Transduktionseffizienz und Expressionslevel der Transgene werden mit üblichen Verfahren überprüft. Die Überlebensrate wird im MTT assay bestimmt (Abbildung 2A). Aus Abbildung 2A geht deutlich hervor, daß nach Therapie mit HV-011, d.h. nach synergistischer Expression von p16 und p53, deutlich weniger Tumorzellen überlebt haben als nach Behandlung mit p16 oder p53 allein. Der Therapieerfolg der Kombination beider Tumorsuppressorgene ist somit signifikant höher, als jedes der Tumorsuppressorgene für sich allein. Im letzteren Fall liegt der Erfolg kaum über Background.
- b. HV-012 ist ein rekombinanter adenoviraler Vektor, der in der Gentherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden kann. Die adenovirale E1 Region wurde in HV-012 durch eine Expressionskassette ersetzt, die die humane p16ink4a cDNA und die humane p53 cDNA über eine IRES-Sequenz miteinander kombiniert (siehe oben). Die p16 cDNA wurde dazu in Schnittstelle 1, die p53 cDNA in Schnittstelle 2 kloniert. HV-012 wurde nach den für in der Gentherapie genutzten rekombinanten Adenoviren üblichen Verfahren hergestellt. Die Tumorzelllinie Hep3B wird bei gleicher MOI mit HV-012, Ad-p53 und Ad-p16 infiziert. Transduktionseffizienz und Expressionslevel der Transgene werden mit üblichen Verfahren überprüft. Die Überlebensrate wird im MTT assay bestimmt (Abbildung 2B). Aus Abbildung 2B geht deutlich hervor, daß nach Therapie mit HV-012, d.h. nach synergistischer Expression von p16 und p53, deutlich weniger Tumorzellen überlebt haben als nach Behandlung mit p16 oder p53 allein. Der Therapieerfolg der Kombination beider Tumorsuppressorgene ist hier wiederum

signifikant höher, als jedes der Tumorsuppressorgene für sich allein. Im letzteren Fall liegt der Erfolg kaum über Background.

- c. Die cDNAs der humanen p14ARF und p53 Gene werden jeweils unter Kontrolle eines CMV-Promoters in das adenovirale Transferplasmid pHVad2 kloniert. Dieses Plasmid wird gemeinsam mit dem Helferplasmid pHVad1 in E.coli BJ5183 transduziert. Durch homologe Rekombination zwischen beiden Plasmiden in den Bakterien entstehen rekombinante adenovirale Vektoren, welchen die E1 Region fehlt und die dafür die entsprechenden therapeutischen Gene p14ARF bzw. p53 exprimieren. Die entsprechenden Viren Ad-p14ARF und Ad-p53 werden nach den für die Gentherapie genutzten rekombinanten Adenoviren üblichen Verfahren hergestellt. Die Tumorzelllinie Hep3B wird bei gleicher MOI mit Ad-p53, Ad-p14ARF und Ad-p14ARF+Ad-p53 infiziert. Transduktionseffizienz und Expressionslevel der Transgene werden mit üblichen Verfahren überprüft. Die Überlebensrate wird im MTT assay bestimmt (Abbildung 3). Aus Abbildung 3 geht deutlich hervor, daß nach Therapie mit Ad-p14ARF+Ad-p53, d.h. nach synergistischer Expression von p14ARF mit p53, deutlich weniger Tumorzellen überlebt haben als nach Behandlung mit p14ARF oder p53 allein. Der Therapieerfolg der Kombination beider Tumorsuppressorgene ist hier wiederum signifikant höher, als jedes der Tumorsuppressorgene für sich allein. Im letzteren Fall liegt der Erfolg kaum über Background.
- d. Die cDNAs der humanen p16 und wig-1 Gene werden jeweils unter Kontrolle eines CMV-Promoters in Vektoren kloniert, die für die Expression in eukaryotischen Zellen geeignet sind. Zu Detektionszwecken wird die hwig1 cDNA N-terminal zusätzlich mit einem Flag-Epitop versehen. Die resultierenden Plasmide pCMV-p16 und pCMV-Flag-hwig1 werden nach Standardmethoden amplifiziert und gereinigt. Die Tumorzelllinie Hep3B wird bei gleichen Plasmidkonzentrationen mit pCMV-p16, pCMV-Flag-hwig1 und pCMV-p16 plus pCMV-Flag-hwig1 transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen fixiert und eine indirekte Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen p16 bzw. das Flag-Epitop und die aktive Form von Caspase 3 (als Apoptosemarker) wird durchgeführt. Anschließend wird jeweils der Prozentsatz der apoptotischen Zellen relativ zur Gesamtzahl der transfizierten Zellen bestimmt (Abb. 4). Aus Abbildung 4 wird deutlich, daß die Kombination aus hwig-1 mit p16 deutlich besser Apoptose in den Tumorzellen induziert als p16 oder hwig-1 allein.

Patentansprüche

1. Kombinationsvektor für den Gentransfer, enthaltend ein einzelnes DNA-Molekül, das mindestens zwei exprimierbare Gene umfaßt.
2. Kombinationsvektor für den Gentransfer nach Anspruch 1 basierend auf einem einzelnen DNA Molekül, das durch die Kombination von mehreren Genen als autark exprimierender Vektor vorliegt und aus mehreren voneinander unabhängigen funktionellen Transkriptionseinheiten bevorzugt in Form von Expressionskassetten unter Verwendung eines DNA-Spacers konstruiert ist.
3. Kombinationsvektor für den Gentransfer nach Anspruch 1, basierend auf einem einzelnen DNA Molekül, das durch die Kombination von mehreren Genen als autark exprimierender Vektor vorliegt und eine polycistronisch organisierten, funktionellen Transkriptionseinheit enthält, bevorzugt eine Expressionskassette, die zwischen den Genen eine IRES-Sequenz (internal ribosom entry site) aufweist.
4. Kombinationsvektor für den Gentransfer nach Anspruch 1, basierend auf einem einzelnen DNA Molekül, das durch die Kombination von mehreren Genen als autark exprimierender Vektor vorliegt und einFusionsgen enthält.
5. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen exprimierten Gene Zellfunktionen steuern bzw. kontrollieren.
6. Kombinationsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene Zellzykluskontrollgene sind.
7. Kombinationsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene Tumorsuppressorgene sind.
8. Kombinationsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene Differenzierungsgene sind.
9. Kombinationsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene Seneszenz-induzierende Gene sind.

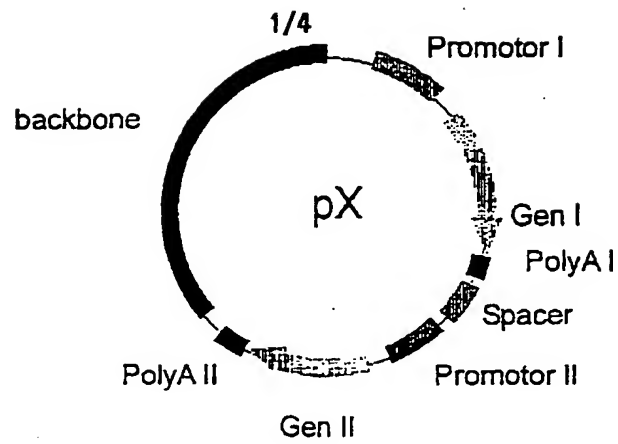
10

10. Kombinationsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene Apoptose-induzierende Gene sind.
11. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene als Wildtyp oder als Modifikation vorliegen.
12. Kombinationsvektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation der exprimierten Gene eine
 - Verlängerung der Gensequenzen,
 - Verkürzung der Gensequenzen,
 - Neuordnung der Gensequenzen,
 - Mutation der Gensequenzenenthält.
13. Kombinationsvektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerung durch VP22 erfolgt.
14. Kombinationsvektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerung durch ,tat' erfolgt.
15. Kombinationsvektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerung durch ,antenapedia' erfolgt.
16. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein exprimiertes Gen aus der Ink 4-Familie oder aus der E2F-Familie stammt.
17. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein exprimiertes Gen p16 ist.
18. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein exprimiertes Gen aus der Gruppe p53, p63 und p73 stammt.
19. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein exprimiertes Gen p14 ARF ist.
20. Kombinationsvektor nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Gene p16 und p53 sind.

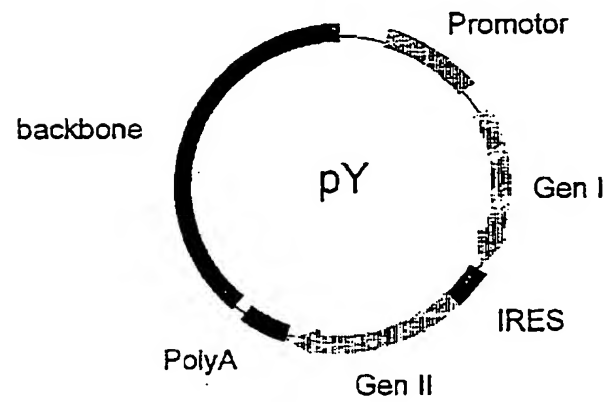
11

21. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 1 bis 20 für den Einsatz auf veränderte, auch krankhafte Erscheinungen in Zellen oder Zellkomplexen.
22. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 1 bis 20 zur therapeutischen Behandlung von Tumoren.
23. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 22 zur therapeutischen Behandlung von Lebertumoren.
24. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 22 zur therapeutischen Behandlung von Mammakarzinomen
25. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 22 zur therapeutischen Behandlung von Lungentumoren.
26. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 22 zur therapeutischen Behandlung von Melanomen.
27. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 22 zur therapeutischen Behandlung von Prostatatumoren
28. Verwendung des Kombinationsvektors nach Anspruch 22 zur therapeutischen Behandlung von Tumormetastasen
29. Verfahren zur Herstellung eines Kombinationsvektors nach Anspruch 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor nach an sich üblichen rekombinanten DNA-Technologien hergestellt wird.
30. Verfahren zur Herstellung des Kombinationsvektors nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor als ein viraler Expressionsvektor hergestellt wird.
31. Verfahren zur Herstellung des Kombinationsvektors nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor in entsprechenden permissiven Zellen produziert wird.
32. Verfahren zur Herstellung des Kombinationsvektors nach Anspruch 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor konfektioniert ist und ein oder mehrere Gene mit oder ohne regulatorische Sequenzen in Zielzellen transferiert.

A



B



C

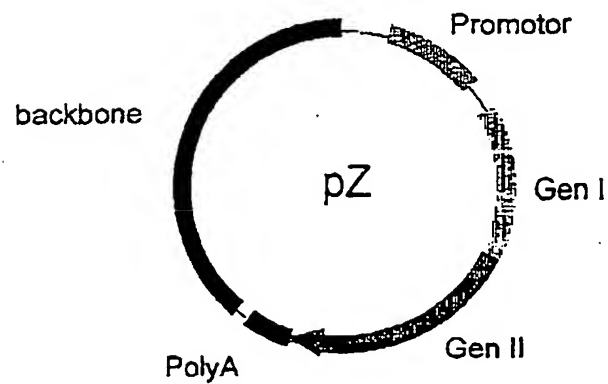
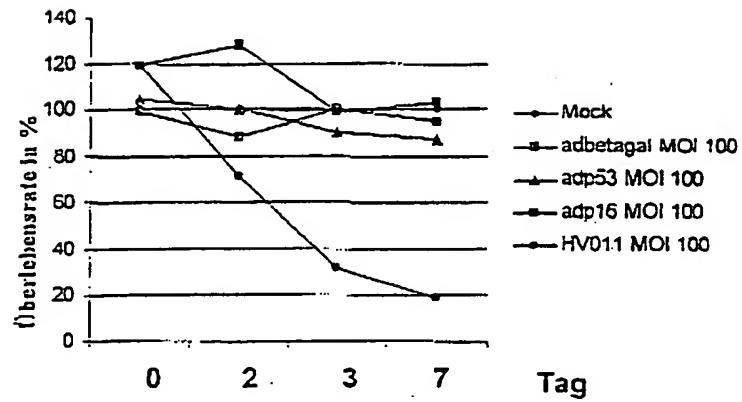


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kombinationsvektoren

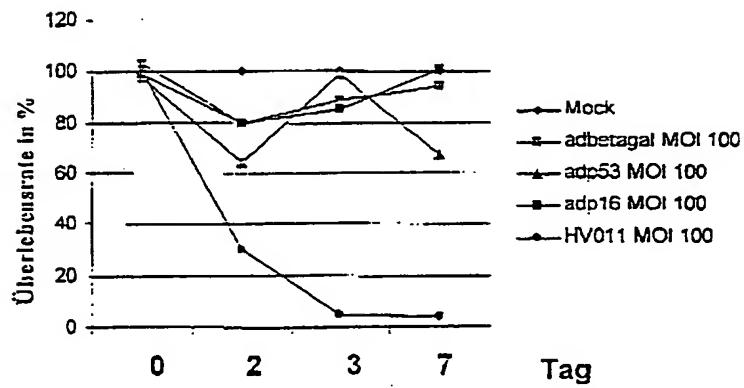
2/4

A

HuH7



Hep3B



B

Hep3B

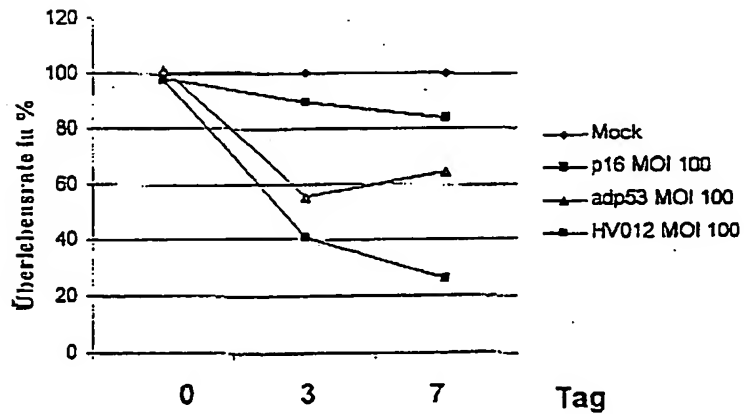


Abbildung 2: Überlebensrate von Tumorzellen nach Infektion mit HV011, HV012, adp53 bzw. adp16. Der MTT assay wurde standardmäßig nach den Angaben des Herstellers (Sigma) durchgeführt.

3/4

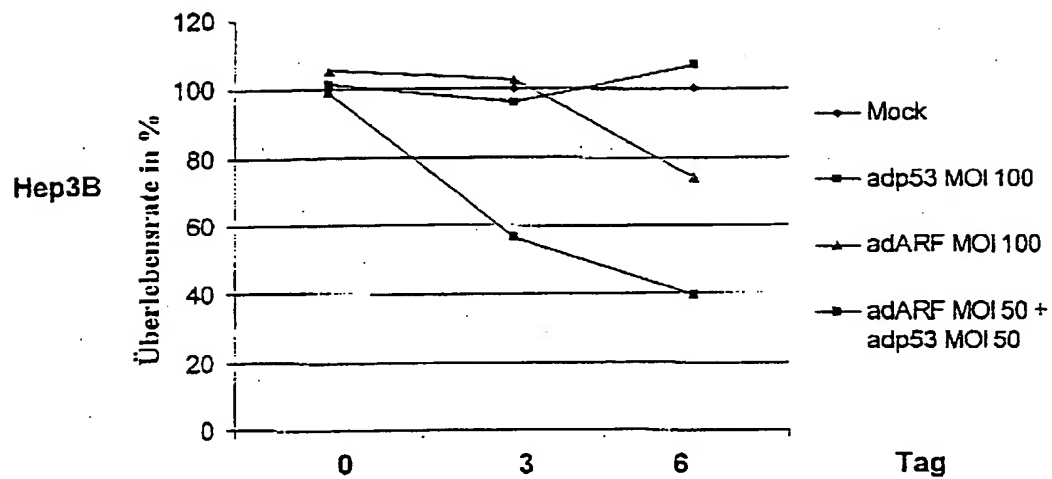


Abbildung 3: Überlebensrate von Tumorzellen nach Infektion mit adp53, adARF bzw. adp53 und adARF. Der MTT assay wurde standardmäßig nach den Angaben des Herstellers (Sigma) durchgeführt.

Hep3B

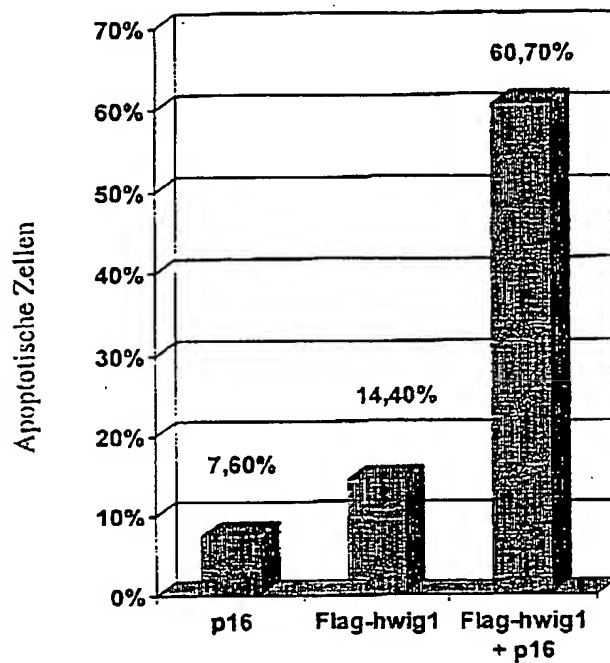


Abbildung 4: Apoptoseinduktion durch Flag-hwig1, p16 bzw. Flag-hwig1 und p16 in Tumorzellen. Hep3B-Zellen wurden mit p16, Flag-hwig1 bzw. p16 und Flag-hwig1 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen p16 bzw. das Flag-Epitop und die aktive Form der Caspase 3 (als Apoptosemarker) durchgeführt. Es wurde dann der Prozentanteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzahl der transfizierten Zellen bestimmt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.